

## EVALUACIÓN DE PREFORMULADOS DE *Beauveria bassiana* (BÁLSAMO) VUILLEMIN, PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ

**Alejandra Bastidas\*, Elena Velásquez Salamanca\*\*, Patricia Marín Marín\*\*\*, Pablo Benavides Machado\*\*\*\*, Alex E. Bustillo Pardey\*\*\*\*\*, Francisco Javier Orozco C. \*\*\*\*\***

\* Estudiante de Agronomía. Universidad de Caldas. E-mail: alej17bastidas@gmail.com

\*\* Investigador Científico I. Disciplina de Entomología. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. E-mail: Elenat.velasquez@cafedecolombia.com

\*\*\* Bacterióloga. Disciplina de Entomología. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. E-mail: patricia.marin@cafedecolombia.com

\*\*\*\* Ing. Agr. Ph.D. Investigador Científico II. Disciplina de Entomología. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. E-mail: pablo.benevides@cafedecolombia.com

\*\*\*\*\* Ing. Agr. M.Sc. Investigador Científico III. Disciplina de Entomología. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. E-mail: alex.bustillo@cafedecolombia.com

\*\*\*\*\* Ing. Agr. M. Sc. Docente. Universidad de Caldas. E-mail: fjorozco@ucaldas.edu.co

Recibido: 18 de febrero; aprobado: 26 de abril de 2010

### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar cinco preformulados (Pf) de *Beauveria bassiana* para el control de la broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), se mezclaron siete coadyuvantes, Tween 80, Glicerina, Carboximetilcelulosa, Goma Arábica, Alginato, Veegum y Almidón hidratado, en diferentes concentraciones y combinaciones con el hongo. La etapa inicial se realizó en los laboratorios de Cenicafé donde se caracterizaron los Pf mediante pruebas microbiológicas, fisicoquímicas y de patogenicidad para seleccionar los dos más eficaces. La etapa de campo se realizó en la Estación Central "Naranjal". En laboratorio los Pf presentaron mejores características que las esporas puras. En la prueba de patogenicidad los Pf 3 y 4 presentaron mayores porcentajes de mortalidad sobre la broca, 97 y 98% respectivamente y el menor tiempo medio de mortalidad 4,4 y 4,7 días respectivamente, estos se evaluaron en campo, comparándolos con un testigo absoluto, un testigo comercial (Bioplág) y esporas puras (sin formular), para determinar el porcentaje de mortalidad sobre la broca. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (Tukey 5%), encontrándose mayor mortalidad para Bioplág (62,2%) seguido por el Pf 4 (32,3%) y las esporas puras (15%). Este resultado muestra la bondad de la preformulación sobre productos que no la poseen. La mortalidad causada por Bioplág comprueba la importancia de Bb en el control de la broca como lo recomienda Cenicafé y justifica la necesidad del diseño de formulaciones donde se pueda adicionar el sustrato arroz que incrementa la eficacia de los preformulados evaluados. La mortalidad de los testigos absolutos, indica que no se presentó contaminación entre tratamientos y refleja la presencia del hongo bajo condiciones naturales.

**Palabras clave:** hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, preformulación, broca del café.

### ABSTRACT

#### EVALUATION OF *Beauveria bassiana* VUILLEMIN PREFORMULATIONS FOR THE COFFEE BERRY BORER CONTROL

In order to evaluate five preformulations (Pf) of the fungus *Beauveria bassiana* for the control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), seven reagents were mixed, Tween 80, Glycerin, Carboxymethylcellulose, Arabic Gum, Alginate, Veegum and hydrated starch, in different concentrations and combinations with the fungus. The initial stage was conducted at Cenicafé laboratories where the Pf's were characterized by means of microbiological, physicochemical and pathogenicity techniques in order to select the two most effective. The field stage was conducted at the "Estación Central Naranjal". Under laboratory conditions, Pf's showed better features in comparison to pure spores. In the pathogenicity test, Pf 3 and 4 had higher mortality rates regarding the coffee berry borer, 97 and 98% respectively, and the lowest average time of mortality 4.4 and 4.7 days, respectively, compared to an absolute witness, a commercial (Bioplág) witness and pure spores (without formulation) in order to determine the mortality percentage on the coffee berry borer. Statistical analysis showed significant differences (Tukey 5%) with higher mortality for Bioplág (62.2%) followed by Pf 4 (32.3%) and the pure spores (15%). This result shows the capacity of preformulations over the products that do not contain it. The mortality caused by Bioplág verifies the importance of Bb in the control of the coffee berry borer as recommended by Cenicafé and justifies the need for the design of formulations which can add the rice substrate that increases the effectiveness of the preformulations evaluated. The mortality of the absolute witnesses suggests that contamination was introduced between treatments and reflects the presence of the fungus under natural conditions.

**Key words:** entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, preformulation, coffee berry borer.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae, Scolytidae), en la actualidad es considerada la plaga que causa mayor daño en el cultivo, por que su ataque se dirige a la almendra o endospermo donde puede reproducirse (Decazy, 1986 ) y su incidencia en los costos de producción es bien conocida por todos los países productores.

En muchas regiones del mundo el problema de la broca es manejado con insecticidas químicos, práctica no recomendable en Colombia ya que las condiciones en las que se desarrolla la caficultura hacen que el ataque sea más severo pues se manejan altas densidades de siembra, cultivos contiguos, topografía de difícil acceso, condiciones climáticas que favorecen las floraciones y fructificaciones durante la mayor parte del año, además de la presencia de las 560.000 familias cafeteras que estarían expuestas a efectos tóxicos (Bustillo, 2002c ).

El uso indiscriminado de estos productos conlleva a graves problemas de contaminación ambiental, residuos no admisibles tanto en la planta como en el suelo, riesgos para la vida animal y el hombre al eliminar fauna benéfica que impide el surgimiento de otros insectos como plaga (Bustillo *et al.*, 1998).

Puesto que la broca es un problema fitosanitario número uno en Colombia, se hace necesaria entonces la utilización de todos los medios y recursos disponibles para combatirla, tales como el manejo agronómico, el control cultural y biológico, el fomento de fauna benéfica, la introducción de parasitoides como *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta* y *Phymastichus coffea*; uso de nematodos entomopatógenos como *Heterorhabditis* spp. y *Steinernema* spp. y el uso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bustillo, 2002c ).

Ya que los hongos entomopatógenos son considerados como los patógenos más promisorios por sus múltiples mecanismos de acción contra insectos plaga, dentro de estos, *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin resulta ser la especie más promisoriosa en

Colombia ya que aparece infectando la broca en forma natural en casi todas las regiones donde esta ha hecho su aparición, siendo de gran importancia en un programa de manejo integrado de broca.

Estas consideraciones han hecho que la Federación Nacional de Cafeteros a través del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) emprenda un amplio programa de investigación que comprende desde la obtención de aislamientos hasta la producción masiva de este hongo, y un programa de introducción en casi toda la zona cafetera que ha convertido a *B. bassiana* en el factor de mortalidad natural más importante de la broca en Colombia (Bustillo, 2002).

Aunque las condiciones ambientales más favorables para la expresión del hongo son humedades relativas altas (superior al 90%) y temperaturas entre 23 y 28 °C, resultados de evaluaciones muestran cómo *B. bassiana* se ve afectado por la temperatura, la humedad relativa y la radiación solar haciendo necesario el empleo de agentes coadyuvantes que aporten niveles de protección a los propágulos infectivos.

Explica Cardona (1998) que una característica de un buen entomopatógeno es su habilidad para resistir condiciones físicas, para el caso de *B. bassiana* factores como la radiación solar, la temperatura y la humedad relativa disminuyen su viabilidad; aunque presenta habilidad para causar epizootias siendo capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo y así persistir. Se hace necesario formular al hongo para mejorar su vida en almacenamiento, su eficacia y permanencia en campo.

Gómez y Villamizar (2000) afirman que el logro de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas que garantizan la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, la evaluación de su actividad biológica, su producción masiva, estudios de preformulación, formulación, estandarización de procesos, elaboración de formulas maestras de producción, determinación de dosis y formas de aplicación y estudios de campo, entre otros.

El desarrollo de metodologías para la producción, separación y formulación de esporas de *B. bassiana* en Cenicafé ha permitido seleccionar ingredientes inertes de acuerdo a propiedades fisicoquímicas, que modifican su comportamiento previniendo reacciones de deterioro y prolongando su tiempo de vida media (Antía *et al.*, 1992; Olarte, 1993; Velásquez, 2002).

En la actualidad diferentes autores han desarrollado formulaciones seleccionando ingredientes inertes que van desde productos de uso común como aceites vegetales, leche o huevos y sus derivados, harinas y residuos vegetales, hasta sustancias químicamente puras como azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa), hidrocoloides (alginatos, gomas, geles de sílice, derivados de celulosa, ligninas), polialcoholes (glicerol, sorbitol), tensoactivos (tweens, span) y aceites (canola, aceite de girasol y de maíz), etc. (Alves *et al.*, 1996; Edgington *et al.*, 2000; Valencia, 2002; Consolo, Salerno y Bero n, 2003; Leland y Behle, 2005).

De esta manera los diferentes ingredientes generan modificaciones en el comportamiento de las esporas, las cuales pueden ser manipulables en la obtención de biopreparados para mejorar la vida media y la estabilidad durante su almacenamiento y aplicación. Además, debe aumentar su efectividad sobre el insecto plaga, permitiendo que un mayor número de esporas se almacene en las membranas intersegmentales susceptibles para asegurar la penetración del hongo en el insecto, mejorar adhesión a la cutícula, aumentar o mantener la virulencia, permitir su aplicación con equipos de ultra bajo volumen y mejorar la eficiencia en campo (Carballo, 1998).

Desde el punto de vista científico producir y evaluar un biopesticida constituido por esporas de *B. bassiana* con características fisicoquímicas y microbiológicas estables y con excelentes condiciones de preparación y de calidad, hace posible explotar el enorme potencial biológico de este hongo en el control de la broca del café.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación se evaluaron cinco preformulaciones y esporas puras del hongo *B. bassiana* (tratamientos) producidas en condiciones de planta piloto.

El experimento se realizó en dos etapas; la primera, se llevó a cabo en el laboratorio de control de calidad y en la planta piloto de control biológico de la disciplina de entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café “Pedro Uribe Mejía”, Cenicafé, Planalto, ubicado en la margen derecha del río Chinchiná (Caldas), a 1413 msnm con temperatura media de 20,8 °C (26,5 °C máxima y 16,5 °C mínima), humedad relativa promedio de 81%, precipitación de 2457 mm/año y 1772 horas/año de brillo solar.

La evaluación en campo, segunda etapa, se realizó en la Estación Central “Naranjal”. Ubicada en la vereda La Quebra del municipio de Chinchiná (Caldas), en un lote con árboles de café de variedad Castillo®, de 3 años y medio de edad, con un área de 12.000 m<sup>2</sup> sembrado a una distancia de 1,40 x 1,40 metros con un total de 4.516 plantas, bajo sombrero de Guamo rabo de mono (*Inga edulis*) sembrado a una distancia de 12 x 12m; la Estación Central “Naranjal” cuenta con una altitud de 1381 m, con temperatura media de 20,8 °C (máxima de 26,8 °C y mínima de 16,4 °C), humedad relativa promedio de 78%, precipitación de 2656 mm/año y 1817 horas/año de brillo solar.

### Elaboración de 5 preformulaciones de esporas de *Beauveria bassiana* y su evaluación en condiciones de planta piloto

El proceso de producción del hongo se realizó en un sistema de cultivo en dos fases, sumergido y superficie, metodología utilizada en la planta piloto de control biológico de Cenicafé para la producción de *B. bassiana* (Olarte, 1993).

Las esporas cumplieron con los siguientes estándares de calidad:

- Concentración de esporas  $8,3 \times 10^{11}$  esporas/g
- Porcentaje de germinación de  $89,50\% \pm 5,08$
- Humedad: 11%

La composición de las preformulaciones (Pf) utilizadas en este estudio se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de las preformulaciones (Pf).

| Coadyuvante                      | Concentración de coadyuvante para 100 g de esporas (g) |      |       |       |       |
|----------------------------------|--|------|-------|-------|-------|
|                                  | Pf 1   | Pf 2 | Pf 3  | Pf 4  | Pf 5  |
| Tween 80                         | -  | 1,2  | 0,006 | 0,001 | 0,01  |
| Glicerina                        | -  | 1,2  | 0,006 | 0,001 | 0,01  |
| Carboximetilcelulosa             | 0,2  | -    | -     | 0,04  | -     |
| Goma Arábica                     | 0,2  | 0,3  | -     | -     | -     |
| Alginato                         | 0,2  | -    | 3     | 0,83  | -     |
| Veegum                           | 0,2  | 0,3  | 6     | -     | 0,005 |
| Almidón hidratado                | -  | 0,3  | -     | -     | 0,005 |
| Esporas Puras <i>B. bassiana</i> | 100  | 100  | 100   | 100   | 100   |

Los diferentes coadyuvantes utilizados en cada una de la preformulaciones seleccionadas en este trabajo, fueron escogidos de acuerdo a estudios previos realizados por Velásquez<sup>1</sup>.

El papel que desempeña cada uno de los productos utilizados en las combinaciones de preformulación se resume en la Tabla 2, que aparece a continuación.

**Tabla 2.** Características de los coadyuvantes de los preformulados de *B. bassiana*.

| Coadyuvante          | Característica  |
|----------------------|---|
| Tween 80             | Tensoactivo, modificador de la tensión superficial y/o humectante de la superficie de la espora para facilitar su acceso a la suspensión final.   |
| Glicerina            | Retenedor de humedad, permite que no se evapore el agua, que la espora mantenga una mínima cantidad de agua dentro de la preformulación.  |
| Carboximetilcelulosa | Viscosante, hace que la velocidad de precipitación sea menor, manteniendo una distribución homogénea de esporas.  |
| Goma Arábica         | Espesante y adherente, favorece el hinchamiento de la formulación, la viscosidad de la suspensión y la adherencia de las esporas al insecto.  |
| Alginato             | Viscosante, tiene capacidad de hidratarse en agua y formar soluciones viscosas y dispersiones contribuyendo a la distribución de las esporas en la suspensión.                                    |
| Veegum               | Desagregante, tiene menor capacidad para expandirse en el agua generando pequeñas fracturas del granulo paso previo para la hidratación del mismo y la obtención de la suspensión de las esporas. |
| Almidón hidratado    | Forma una suspensión coloidal o masa viscosa y elástica sobre la espora que la protege dentro del gránulo y además contribuye a la viscosidad de la suspensión final.                             |

<sup>1</sup> Datos sin publicar: Dr. Elena Velásquez. Investigador Científico II, Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

La elaboración de los preformulados se realizó siguiendo la metodología descrita por Velásquez (2002).

Las esporas puras y las preformulaciones se empacaron en recipientes plásticos de 250 gramos de capacidad, adicionados de una película sellante en la boca del frasco antes de cerrar la tapa. En cada frasco se empacaron 100 gramos de esporas de *B. bassiana* preformuladas.

Una vez terminada la elaboración de las preformulaciones, se realizó en condiciones de laboratorio la caracterización de cada preformulación mediante las técnicas estandarizadas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos (Marín y Bustillo, 2002) que contienen las siguientes pruebas:

- Prueba de pureza.
- Concentración de esporas.
- Porcentaje de germinación.
- pH.
- Porcentaje de humedad.
- Humectabilidad.
- Suspensibilidad.
- Adherencia.

### Evaluación de las preformulaciones y esporas puras del hongo *B. bassiana* en condiciones de planta piloto

En la Tabla 3, se describen las preformulaciones a evaluar y los testigos (tratamientos).

**Tabla 3.** Descripción de los tratamientos a evaluar en la etapa de laboratorio.

| Tratamiento | Descripción de tratamientos  |
|-------------|--|
| 1           | Esporas puras + Carboximetilcelulosa + Goma Arábica + Alginato + Veegum          |
| 2           | Esporas puras + Tween 80 + Glicerina + Goma Arábica + Veegum + Almidón hidratado |
| 3           | Esporas puras + Tween 80 + Glicerina + Alginato + Veegum                         |
| 4           | Esporas puras + Tween 80 + Glicerina + Carboximetilcelulosa + Alginato           |
| 5           | Esporas puras + Tween 80 + Glicerina + Almidón hidratado + Veegum                |
| 6           | Esporas puras  |
| 7           | Testigo absoluto   |

La evaluación de las 5 preformulaciones y de las esporas puras se realizó mediante una prueba de patogenicidad con dos modalidades de infección.

Las dos modalidades de infección a estudiar fueron:

- Inmersión de brocas en la suspensión de esporas, prueba de patogenicidad convencional.
- Aspersión de esporas en área controlada mediante la torre de Potter.

### Modalidad de infección por inmersión

La prueba consistió en tomar las unidades de observación (brocas), desinfectarlas con una solución de Hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos, posteriormente se lavaron con ADE. Para la aplicación de los tratamientos, se sumergieron las brocas en una suspensión de esporas del hongo ( $1 \times 10^7$  e /ml). Luego, se individualizaron en viales de vidrio con discos de papel toalla humedecido con ADE y se taparon con algodón.

Las unidades de observación se hidrataron con agua destilada estéril diariamente durante 11 días y permanecieron a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ; se evaluó el crecimiento del hongo sobre las brocas mediante observación de los síntomas y signos de la enfermedad al estereoscopio.

### Modalidad de infección por aspersión

Para realizar esta prueba se utilizó el método de aspersión controlada con la torre de Potter, asperjando las brocas con una suspensión con concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml; y se siguió el mismo procedimiento de la prueba de patogenicidad convencional.

Cada tratamiento estuvo conformado por 10 unidades experimentales y cada unidad experimental conformada por 10 brocas (unidades de observación); en el testigo absoluto las unidades de observación no entraron en contacto con el hongo. Las unidades experimentales fueron asignadas aleatoriamente a los tratamientos, de acuerdo con el diseño experimental completamente aleatorio.

El número de unidades experimentales fue determinado estadísticamente de acuerdo con la varianza obtenida en el trabajo “Evaluación de la eficacia de mezclas de cepas del hongo *B. bassiana* para control de la broca del café *H. hampei*” (81 .69), asociada al promedio del porcentaje de mortalidad por hongo, una diferencia mínima del 7,5% de mortalidad, un nivel de significancia del 5% y una confiabilidad mayor al 80%.

Una vez realizada la infección por las dos modalidades, diariamente se registró la mortalidad de las brocas y se registró la presencia del hongo. Con esta información se obtuvo el porcentaje de mortalidad por unidad experimental al cabo de 11 días.

Con la información diaria de mortalidad de broca, se identificó el tiempo transcurrido en que la broca muere por acción del hongo y con esta información

se obtuvo la variable de respuesta tiempo medio de mortalidad de las brocas por acción del hongo por unidad experimental.

Como variables de respuesta se definió el porcentaje de mortalidad de brocas por el hongo y tiempo promedio de mortalidad de las brocas por acción del hongo y con ellas, para cada modalidad, se realizó el siguiente análisis estadístico.

- Estimación del promedio y variación por tratamiento.
- Análisis de varianza de una vía, al 5%.
- Prueba de Tukey al 5%, con la cual se seleccionaron las dos preformulaciones con mayor porcentaje de mortalidad y menor tiempo medio de mortalidad de las brocas por acción del hongo (lo s más eficaces), para ser evaluadas en campo, como se describe en la segunda etapa.

### Etap 2. Evaluación en campo de las dos preformulaciones seleccionadas en condiciones de laboratorio.

Los tratamientos a evaluar en campo se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Descripción de los tratamientos a evaluar en campo.

| Tratamiento | Descripción de tratamientos               |
|-------------|---|
| 1           | Preformulado más eficaz en laboratorio    |
| 2           | Preformulado más eficaz en laboratorio    |
| 3           | Testigo comercial                         |
| 4           | Esporas puras                             |
| 5           | Testigo absoluto: Adentro de las parcelas |
| 6           | Testigo absoluto: Afuera de las parcelas  |

Para la selección del testigo comercial, se sometieron dos formulaciones comerciales de *B. bassiana* (Bioprotección y Soluciones Microbianas del

Trópico), a las pruebas microbiológicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos, de acuerdo con la metodología estandarizada por Marín y Bustillo (2002). Con base en los resultados, se seleccionó la formulación que presentó el mayor porcentaje de germinación de esporas y el mayor porcentaje de mortalidad de broca.

Las parcelas experimentales fueron asignadas a los tratamientos, de acuerdo con el diseño completamente aleatorio. Cada tratamiento tuvo 10 parcelas experimentales, conformadas por 77 árboles; la parcela efectiva estuvo conformada por la planta ubicada en el centro de la parcela experimental y en ella se tomó una rama de la zona productiva, donde se dejaron 50 frutos de aproximadamente 150 días de desarrollo.

Una vez seleccionada la rama se instaló una manga entomológica elaborada en una estructura cilíndrica hecha de alambre calibre N° 10 de 40 cm de largo y 20 cm de diámetro y se cubrió con una tela muselina blanca, según la metodología descrita por Villalba, Bustillo y Chaves (1995).

Antes de aplicar los tratamientos, se realizó una infestación artificial, utilizando una relación 4:1, se utilizaron brocas activas recién emergidas (24 horas) de frutos brocados procedentes de la unidad de cría de Cenicafé; los cuales se colocaron en recipientes plásticos de fotografía con trozos de papel (confeti). Una vez instaladas las mangas, se realizó la infestación de todas las unidades experimentales de los diferentes tratamientos, se repartieron 200 brocas dentro de las mangas usando un tamiz para separar las brocas del confeti.

Después de la infestación, se cerró la manga con una fibra de polipropileno y se sujetó a la rama superior con el fin de mantenerla horizontalmente. Las mangas se dejaron instaladas en campo 24 horas, después, se observó que más del 85% de los frutos se encontraban infestados y se sacaron de las mangas las brocas que no perforaron.

Para la aplicación de cada tratamiento se utilizó un equipo de aspersión de presión previa retenida (PPR), Triunfo 40-100-10 calibrada a 40 psi de presión constante, con una boquilla TX-3 para una salida de 190 cc/min con un ángulo de salida de 70.

El volumen de aplicación y la concentración de esporas/árbol se calculó a partir del número promedio de ramas y de la altura de las plantas, evaluando 35 árboles al azar dentro del lote.

Con esta información y con la concentración obtenida en laboratorio de cada tratamiento se estimó la cantidad necesaria de cada tratamiento para su aplicación. Para cada tratamiento se utilizó un volumen de 1 cc y una concentración de  $6,5 \times 10^7$  esporas/rama; los testigos absolutos adentro y afuera de las parcelas experimentales se asperjaron con agua, para la formulación comercial y las esporas puras, se tomó la cantidad necesaria y se mezcló con 3 cc de aceite agrícola Carrier; posteriormente se aforó hasta el volumen necesario para cada aplicación.

Treinta días después de la aplicación de los tratamientos, se cortaron las ramas, se retiraron los frutos de cada tratamiento y se individualizaron en bolsas plásticas, con el propósito de aislar unos de otros para evitar su contaminación.

Los frutos recolectados de campo se llevaron al laboratorio con el fin de disectarlos, cuantificar y registrar el número de adultos vivos, número de adultos muertos sin signos del hongo, número de adultos muertos con el hongo y posición dentro del fruto.

Las brocas muertas sin signos de la enfermedad se llevaron a cajas de Petri con trozos de papel toalla estéril humedecido creando una cámara húmeda. Y se cuantificó el porcentaje de mortalidad.

Con la variable de respuesta porcentaje de brocas muertas por el tratamiento (hongo), 30 días después de la aplicación de los tratamientos en campo se realizó el siguiente análisis estadístico.

- Estimación de promedios y varianza por tratamiento.
- Análisis de varianza, sin contar con los testigos absolutos, bajo el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio, al 5%, con la variable de respuesta.
- Prueba de Tukey al 5%, para seleccionar aquellos con mayor promedio de mortalidad de broca.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapas 1. Elaboración de las preformulaciones y análisis de las características biológicas y fisicoquímicas.

En la concentración de esporas después de realizar su preformulación, se observó una disminución de la concentración de esporas/gramo en los preformulados con respecto a la concentración inicial, la cual fue de  $8,3 \times 10^{11}$  en esporas puras y a partir de la cual se elaboraron los preformulados (Tabla 5). Se observó que las esporas puras y los preformulados 1 y 4 fueron iguales estadísticamente (Tukey al 5%), pero diferentes de los preformulados 2, 3 y 5, lo que se atribuye a la cantidad de coadyuvantes presentes en cada uno de los preformulados y al contenido mínimo de humedad final de los mismos por la relación peso-volumen.

**Tabla 5.** Composición final de las preformulaciones (Pf) de esporas de *B. bassiana*.

| Preformulado  | % Total de coadyuvante en los Pf | % Total de esporas en la Pf | Concentración (esporas/g) |
|---------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1             | 0,79                             | 99,2                        | $8,13 \times 10^{11}$ a*  |
| 2             | 10,21                            | 89,8                        | $5,5 \times 10^{11}$ b    |
| 3             | 8,35                             | 91,73                       | $6,16 \times 10^{11}$ b   |
| 4             | 0,872                            | 99,13                       | $7,66 \times 10^{11}$ a   |
| 5             | 0,029                            | 99,97                       | $5,8 \times 10^{11}$ b    |
| Esporas puras | 0                                | 100                         | $8,3 \times 10^{11}$ a    |

\*Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

La concentración de esporas es un factor de importancia económica, la cantidad de esporas/g determina la cantidad de árboles que se asperjan en campo; en este caso, con las esporas puras, el preformulado 1 y el 4 se podrían asperjar un promedio de 812 árboles/g, mientras que con los preformulados 2, 3 y 5 en promedio 589 árboles, utilizando la dosis recomendada para Bb en campo, que es  $1 \times 10^9$  esporas/árbol.

La prueba de germinación mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, variando entre 61,1% para las esporas puras y lográndose la mayor germinación (96,1%) con el preformulado 3. Todos los demás preformulados fueron estadísticamente diferentes a las esporas puras fluctuando entre valores del 83,8% y 89,7%.

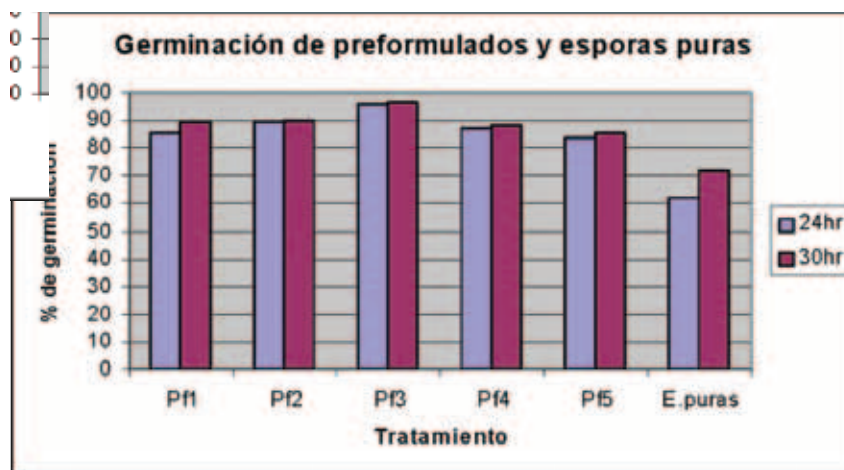
**Tabla 6.** Porcentaje de germinación y prueba de pureza de los preformulados de esporas de *B. bassiana*.

| Preformulado  | % Germinación (13 dde) (24 h en Agar-Agua al 1,5%) | Prueba de pureza (%) |
|---------------|--|----------------------|
| 1             | 85,59 bc*  | 100                  |
| 2             | 89,69 b  | 100                  |
| 3             | 96,09 a  | 100                  |
| 4             | 87,08 bc   | 100                  |
| 5             | 83,76 c  | 100                  |
| Esporas puras | 61,11 d  | 100                  |

13 dde: días después de elaborado. \* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

La germinación fue superior al 83% indicando que este factor no es afectado durante el proceso de formulación, ya que los coadyuvantes utilizados no interactúan con las esporas. Diferentes autores mencionan que a través de una formulación se mejora la estabilidad y la vida de almacenamiento de las esporas (Alves *et al.*, 1996; Marques, Alves y Marques, 1999; Consolo *et al.*, 2000; Edginton *et al.*, 2000), lo que se corrobora en los resultados obtenidos con las esporas puras almacenadas a temperatura ambiente, que disminuyeron su porcentaje de germinación con respecto a las esporas formuladas, sólo con 13 días de estar almacenadas a temperatura ambiente.

Se cuantificaron los porcentajes de germinación de los preformulados y de las esporas puras a las 24 y 30 h. Observando cómo la germinación de los preformulados aumenta con el tiempo de lectura; para las esporas puras las cuales presentaron inicialmente una reducción drástica en el porcentaje de germinación, éste muestra la misma tendencia, sin embargo, la germinación es inferior al 80% hasta las 30 h de evaluación (Figura 1).



**Figura 1.** Germinación de los preformulados y esporas puras a las 24 y 30 h.

El proceso de secado de los preformulados en estufa a 30 °C, no alteró la capacidad de la espora para germinar, lo que es reportado por Fajardo y Rodríguez (1995), donde la capacidad y velocidad de germinación de las esporas de *B. bassiana* no se afectan al ser sometidas a temperaturas de 30 y 40 °C, combinada con una baja humedad.

En la prueba de pureza no se identificó ningún microorganismo contaminante, con lo que se concluye que los procesos de producción y de formulación fueron los adecuados ya que se superó el rango óptimo, el cual debe ser superior al 90% según las normas de control de calidad de hongos entomopatógenos establecidas.

En las pruebas fisicoquímicas el valor de pH, influye en la germinación del hongo, retardándola cuando no se encuentra dentro de los intervalos óptimos, el cuál es entre 5,5 y 7,0; para este caso los preformulados evaluados y las esporas puras se encontraron dentro del intervalo mencionado (Tabla 7).

**Tabla 7.** pH y porcentaje de humedad.

| Preformulado  | pH   | % Humedad |
|---------------|------|-----------|
| 1             | 6,03 | 8,2       |
| 2             | 6,02 | 6,81      |
| 3             | 6,32 | 8,02      |
| 4             | 6,4  | 5,05      |
| 5             | 5,81 | 7         |
| Esporas puras | 6,24 | 11,02     |

El porcentaje de humedad estuvo en un rango óptimo entre el 5 y 8% (Tabla 7); el contenido de humedad es determinante para incrementar la vida de almacenamiento del formulado, las bajas humedades evitan reacciones que conducen al deterioro del hongo (Fajardo y Rodríguez, 1995), enfatizando que el contenido de humedad debe reducirse hasta 5% para almacenamiento a largo plazo (Hernández, 2003), además, las esporas con bajos contenidos de humedad, entre 4 y 5% presentan una gran tolerancia

a altas temperaturas hasta de 40 °C (Hedgecock *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2001).

Las técnicas para el control de calidad, mostraron que los preformulados 1 y 2 presentaron una humectabilidad más rápida con respecto a los demás preformulados (antes de 3 minutos); el preformulado 3 se humectó el 50% (después de 60 minutos) y los preformulados 4 y 5 no se humectaron (Tabla 8). Según Vélez *et al.* (1997), los coadyuvantes utilizados en las formulaciones de hongos deben ser de alta humectabilidad, sino no es así, con esa formulación sería necesario realizar la prueba de taponamiento de boquillas. Sin embargo, esta característica puede ser explicada por los mecanismos de humectación los cuales son inmersión, adhesión y extensión. Dependiendo del ángulo de contacto las partículas se mojarán con mayor o menor facilidad, si el ángulo es menor a 90° la partícula se va a mojar y si es mayor a 90° el líquido no puede mojar la partícula sólida.

En este caso, en los preformulados 1 y 2, se presentó una humectación por inmersión y en los preformulados 3, 4 y 5 la humectación fue por adhesión y/o extensión; mediante una determinación visual todos los preformulados evaluados al momento de agitarlos mostraron una rápida desagregación, lo cual indica que ninguno de los preformulados formó agregados, motivo por el cual no fue necesario realizar la prueba de taponamiento de las boquillas, ya que mostraron una rápida dispersión y suspensión.

Según la prueba de humectabilidad descrita en las pruebas de calidad, aunque la naturaleza de los coadyuvantes que constituyen los preformulados, no permiten una humectación por inmersión, la rápida desagregación del formulado evidencia que está operando un mecanismo de humectación no detectado por la prueba. Por lo tanto, se recomienda tener en cuenta los mecanismos de humectación en las técnicas estandarizadas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos.

**Tabla 8.** Humectabilidad y suspensibilidad de los preformulados.

| Tratamiento    | Humectabilidad |      |                | % Suspensibilidad |
|----------------|----------------|------|----------------|-------------------|
|                | Min.           | Seg. | Obs.           |                   |
| Preformulado 1 | 2              | 51   | Se humectó     | 81,04             |
| Preformulado 2 | 0              | 58   | Se humectó     | 66,64             |
| Preformulado 3 | 60             | 5    | 50% se humectó | 112,71            |
| Preformulado 4 |                |      | No se humectó  | 161,53            |
| Preformulado 5 |                |      | No se humectó  | 56,01             |
| Esporas puras  |                |      | No se humectó  | 57,93             |

El porcentaje de suspensibilidad (Tabla 8) indica que las esporas se mantienen floculadas por ayuda de los coadyuvantes durante los 50 minutos de la prueba descrita en el control de calidad de formulaciones, es decir que las esporas se desplazan a través del tanque de mezcla pero no se decantan ni se compactan, haciendo que con una leve agitación se consiga la redispersión de la suspensión.

La suspensibilidad se relaciona directamente con la humectabilidad. Con respecto al primer factor, se observó cómo los preformulados que se humectaron por inmersión tuvieron una distribución más homogénea, es decir, un porcentaje de suspensibilidad cercano a 100%; y en los preformulados 3, 4 y 5 donde se presentó una humectabilidad por adhesión y/o

extensión (más lenta), la suspensibilidad se comportó diferente, no fue homogénea.

Después de observar lo ocurrido con respecto a la suspensibilidad en los preformulados 3 y 4, se realizó una prueba adicional con el objetivo de observar la distribución de las esporas en la suspensión. Se observó en el preformulado 3 una mayor concentración de las esporas en la parte del centro hacia arriba de la probeta, mientras que en el preformulado 4 las esporas se suspendieron en mayor porcentaje en el centro de la probeta lo que nos indica que aun teniendo las esporas en reposo, un porcentaje de estas se mantiene floculado (Tabla 9), aunque se presenten desplazamientos hacia arriba y abajo indicando flotación o asentamiento de los flóculos formados como resultado de la formulación.

**Tabla 9.** Suspensibilidad de los preformulados 3 y 4.

| Tratamiento       | Preformulado 3 |         |        | Preformulado 4 |         |        |
|-------------------|----------------|---------|--------|----------------|---------|--------|
|                   | Arriba*        | Centro* | Abajo* | Arriba*        | Centro* | Abajo* |
| % Suspensibilidad | 126,25         | 112,71  | 73,33  | 137            | 161,53  | 54,42  |

\* Posición en la probeta.

Sobre la característica, adherencia de los preformulados a la broca del café, se referencia la interacción que existe entre el tipo de formulación y el método de exposición de las brocas. Arrubla, Cárdenas y Posada (2000), encontraron que hay una mayor adherencia de las esporas en polvo que las formuladas en aceite, sin embargo, las esporas formuladas en aceite evitan la fácil remoción por el viento y garantizan la permanencia de las esporas por más tiempo en el campo.

En este caso, con el método de aspersión utilizando la torre de Potter, se garantiza un cubrimiento total de las brocas, nos da la ventaja de poder cuantificar directamente las esporas de la suspensión madre teniendo una idea más cercana de lo que puede ocurrir con cada uno de los preformulados en condiciones de campo.

**Tabla 10.** Adherencia de los preformulados de *B. bassiana* a la broca del café.

| Preformulado  | Concentración inicial<br>esporas/ml | Concentración final<br>esporas/ml | % de adherencia* |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| 1             | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 7,94 x 10 <sup>5</sup> ± 0,25     | 7,94             |
| 2             | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 4,92 x 10 <sup>5</sup> ± 0,28     | 4,92             |
| 3             | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 1,87 x 10 <sup>6</sup> ± 0,07     | 18,70            |
| 4             | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 8,77 x 10 <sup>5</sup> ± 0,25     | 8,77             |
| 5             | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 7,55 x 10 <sup>5</sup> ± 0,53     | 7,55             |
| Esporas puras | 1 x 10 <sup>7</sup>                 | 7,05 x 10 <sup>5</sup> ± 0,34     | 7,05             |

\* Por exposición de brocas en torre de Potter, utilizando 2 ml de solución con una concentración de 1 x 10<sup>7</sup> esporas/ml, para cada tratamiento.

En esta evaluación el mejor porcentaje de adherencia se obtuvo con el preformulado 3 (18,70%), seguido por el preformulado 4 (8,77%), los demás preformulados presentaron porcentajes de adherencia inferiores al 8% (Tabla 10). Lo cual se vio reflejado en el porcentaje de mortalidad obtenido en condiciones de laboratorio, donde las preformulaciones 3 y 4 presentaron los mejores resultados de mortalidad de brocas por acción del hongo; aunque estos porcentajes no son altos, la cantidad de esporas recogidas son suficientes para garantizar la infección de la broca, teniendo en cuenta la CL50 que es 2 entre 2 y 23 esporas/cm (Posada, 1998), su eficacia en campo depende de las condiciones ambientales.

#### Evaluación de las preformulaciones y esporas puras del hongo *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio

#### Prueba de patogenicidad por dos modalidades de infección

Para la variable de respuesta porcentaje de mortalidad de broca por hongo en laboratorio en la modalidad 1, por inmersión de las brocas en una suspensión de 1 x 10<sup>7</sup> esporas/ml, el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos. La prueba de comparación (Tukey al 5%) indicó mayores porcentajes para los preformulados 1 y 4, en tanto, el preformulado 2 y las esporas puras mostraron menores porcentajes de mortalidad; los preformulados 3 y 5 no presentaron diferencias con respecto a los demás tratamientos (Tabla 11). El porcentaje de mortalidad de las brocas fluctúa entre 88 y 99% lo que indica que todos los preformulados ofrecen un control de la broca del café mayor al 80% en laboratorio. En el testigo absoluto no se presentó mortalidad de las brocas por acción del hongo.

**Tabla 11.** Porcentaje de mortalidad promedio de broca utilizando preformulados de *B. bassiana* para la modalidad de infección por inmersión.

| Tratamiento      | % de Mortalidad |               |
|------------------|-----------------|---------------|
|                  | X               | C.V (%) ± E.E |
| Pf 1             | 99 a*           | 3,19 ± 1,3    |
| Pf 2             | 88 b            | 10,44 ± 2,9   |
| Pf 3             | 97 ab           | 6,95 ± 2,1    |
| Pf 4             | 98 a            | 4,30 ± 3,1    |
| Pf 5             | 96 ab           | 5,37 ± 1,3    |
| Esporas puras    | 88 b            | 11,73 ± 1,6   |
| Testigo absoluto | 0               | 0             |

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

En cuanto a la variable de respuesta tiempo medio de mortalidad de brocas por acción del hongo en esta misma modalidad, el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos; la prueba Tukey al 5% mostró que los preformulados 3 y 4 presentaron los tiempos más cortos de mortalidad, 4,43 y 4,68 días respectivamente, siendo estadísticamente diferentes

de los preformulados 1 y 5 que presentaron un tiempo medio de mortalidad entre 5,37 y 5,40 días. Con todos los tratamientos se logró obtener una mortalidad de las brocas entre 4,43 y 6,64 días, siendo el preformulado 2 diferente estadísticamente del resto de los tratamientos causando la mortalidad de las brocas en el mayor tiempo, 6,6 días (Tabla 12).

**Tabla 12.** Tiempo medio de mortalidad de broca utilizando preformulados de *B. bassiana* para la modalidad de infección por inmersión.

| Tratamiento      | Tiempo medio Mortalidad |                    |
|------------------|-------------------------|--------------------|
|                  | X                       | C.V (%) $\pm$ E. E |
| Pf 1             | 5,37 b*                 | 6,80 $\pm$ 0,4     |
| Pf 2             | 6,64 a                  | 4,94 $\pm$ 0,4     |
| Pf 3             | 4,43 d                  | 12,78 $\pm$ 0,3    |
| Pf 4             | 4,68 dc                 | 6,34 $\pm$ 0,4     |
| Pf 5             | 5,40 b                  | 10,09 $\pm$ 0,5    |
| Esporas puras    | 5,26 bc                 | 10,63 $\pm$ 0,4    |
| Testigo absoluto | 0                       | 0                  |

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

Para la variable de respuesta porcentaje de mortalidad de la broca en condiciones de laboratorio con la modalidad 2, por aspersión de las brocas con una suspensión de  $1 \times 10^7$  esporas/ml utilizando un equipo de micro-aspersión (torre de Potter), el análisis de varianza no mostró efecto de los tratamientos. El porcentaje de mortalidad fluctuó entre 36 y 58%,

siendo estos valores más bajos que los obtenidos con el método 1 (inmersión) (Tabla 13), lo que se explica por el método de aspersión utilizado, el cual se evaluó buscando que los insectos tuvieran un contacto con las esporas del hongo en condiciones similares a lo que ocurre con una aspersión en campo.

**Tabla 13.** Porcentaje de mortalidad promedio de broca utilizando preformulados de *B. bassiana* para la modalidad de infección por aspersión.

| Tratamiento      | % de Mortalidad |                   |
|------------------|-----------------|-------------------|
|                  | X               | C.V (%) $\pm$ E.E |
| Pf 1             | 58 a*           | 34,29 $\pm$ 6,3   |
| Pf 2             | 39 a            | 42,64 $\pm$ 4,8   |
| Pf 3             | 53 a            | 41,76 $\pm$ 7,3   |
| Pf 4             | 36 a            | 41,82 $\pm$ 4,8   |
| Pf 5             | 49 a            | 36,57 $\pm$ 5,7   |
| Esporas puras    | 44 a            | 43,12 $\pm$ 6     |
| Testigo absoluto | 0               | 0                 |

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

Con respecto al tiempo medio de mortalidad el análisis de varianza no mostró efecto de los tratamientos; los tiempos de mortalidad fluctuaron entre 6,77 días para

el preformulado 1 y 8,23 días para el preformulado 5 (Tabla 14).

**Tabla 14.** Tiempo medio de mortalidad de broca utilizando preformulados de *B. bassiana* para la modalidad de infección por aspersión.

| Tratamiento      | Tiempo medio Mortalidad |                   |
|------------------|-------------------------|-------------------|
|                  | X                       | C.V (%) $\pm$ E.E |
| Pf 1             | 6,77 a*                 | 17,01 $\pm$ 0,8   |
| Pf 2             | 7,97 a                  | 11,55 $\pm$ 0,6   |
| Pf 3             | 7,66 a                  | 9,43 $\pm$ 0,5    |
| Pf 4             | 7,91 a                  | 18,13 $\pm$ 0,6   |
| Pf 5             | 8,23 a                  | 7,73 $\pm$ 0,5    |
| Esporas puras    | 6,88 a                  | 29,16 $\pm$ 0,9   |
| Testigo absoluto | 0                       | 0                 |

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

Según los resultados obtenidos en la modalidad 1 con las variables de respuesta porcentaje promedio de mortalidad de brocas y su tiempo medio de mortalidad, los preformulados 3 y 4 fueron escogidos para continuar la etapa de evaluación bajo condiciones de campo, teniendo en cuenta su eficacia con porcentajes de mortalidad de 97 y 98%, en un menor tiempo medio de mortalidad, 4,43 y 4,68 días respectivamente. Los resultados de la modalidad 2 no permitieron una selección de los preformulados, ya que no hubo diferencias significativas entre estos; el porcentaje de mortalidad por hongo en esta modalidad estuvo entre 36 y 58% con un tiempo medio de mortalidad entre 6,67 y 8,23 días.

## Etapa 2. Evaluación en campo de las dos preformulaciones seleccionadas en condiciones de laboratorio.

### Selección del testigo comercial

El testigo comercial se seleccionó de acuerdo con la metodología utilizada para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos (Marín y Bustillo, 2002); mediante las pruebas de germinación, patogenicidad y tiempo medio de mortalidad, se pudo determinar que las mejores características las presentaba el producto comercial Bioplág (Tabla 15), razón por la cual se llevó a la segunda etapa para ser evaluado en condiciones de campo.

**Tabla 15.** Resultados de la evaluación del testigo comercial.

| Formulación comercial | Concentración de esporas/g | Germinación (%) | Patogenicidad (%) | Tiempo medio de mortalidad |
|-----------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| Bioplág               | 1 x 1010                   | 81,14 $\pm$ 1,5 | 95,5              | 4,0 $\pm$ 1                |
| Bovetrópico           | 1,1 x 1010                 | 0,4 $\pm$ 0,5   | 68,8              | 7,6 $\pm$ 0,7              |

### Mortalidad de las brocas por acción del hongo en condiciones de campo

Para la variable de respuesta porcentaje de mortalidad de las brocas por acción del hongo en condiciones de campo, el análisis de varianza mostró efecto entre los tratamientos con una potencia de la prueba del 99%. La prueba de comparación Tukey al 5%, sin contar con los testigos absolutos, mostró diferencias

estadísticas significativas a favor del producto comercial Bioplág con un porcentaje de mortalidad de 62,19% seguido por el preformulado 4 con 32,32% de mortalidad, el cual fue mayor que las esporas puras con el que se obtuvo un 15,06% de mortalidad de broca. Las esporas puras no fueron diferentes estadísticamente del preformulado 3 con el cual se obtuvo una mortalidad de 25,51% (Tabla 16).

**Tabla 16.** Porcentaje de mortalidad promedio de broca en campo por acción del hongo *B. bassiana* preformulado.

| Tratamiento                                | Porcentaje de mortalidad |                   |
|--|--------------------------|-------------------|
|  | X                        | C.V (%) $\pm$ E.E |
| Preformulado 3                             | 25,51 bc*                | 45,18 $\pm$ 3,6   |
| Preformulado 4                             | 32,32 b                  | 39,09 $\pm$ 3,9   |
| Testigo Comercial (en arroz)               | 62,19 a                  | 25,28 $\pm$ 4,9   |
| Esporas puras                              | 15,06 c                  | 69,67 $\pm$ 3,3   |
| Testigo absoluto (Adentro de las parcelas) | 4,25 d                   | 62,90 $\pm$ 0,8   |
| Testigo absoluto (Afuera de las parcelas)  | 4,01 d                   | 71,06 $\pm$ 0,9   |

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticas entre promedios, según la prueba de Tukey al 5%.

No se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos 5 y 6 (testigos absolutos adentro y afuera de las parcelas experimentales); los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron de 4,25 y 4,01% respectivamente según la prueba de Tukey al 5% (Tabla 16). Este porcentaje corrobora la presencia natural de *B. bassiana*, e indica que no se presentó contaminación entre los tratamientos.

La investigación de las formulaciones tiene un potencial encaminado a mejorar la estabilidad biológica en condiciones ambientales y la eficacia en la aplicación de *B. bassiana* en campo, teniendo en cuenta que las esporas del hongo son fuertemente hidrofóbicas y obligan a profundizar en la elaboración de formulaciones portadoras del hongo. En este sentido la combinación de los coadyuvantes Tween 80, Glicerina, Carboximetilcelulosa y Alginato presentes en el preformulado 4, proporcionaron un nivel de protección encapsulando las esporas, manteniendo su estabilidad biológica y potencializando su actividad

biocontroladora en campo, causando mortalidad de 32,32%, estadísticamente superior al 15,06% de las esporas puras que demostraron una actividad menor.

El porcentaje de mortalidad del 62,19% que causó el testigo comercial en condiciones de campo, se puede atribuir a que durante el tiempo de almacenamiento las esporas no se separaron del sustrato de arroz, este sustrato y el subproducto de la interacción del hongo con el arroz ayudan a preservar la actividad del hongo, lo cual se vio reflejado con su eficacia en campo.

Por otro lado se puede pensar, que estas esporas que permanecen durante su almacenamiento en el sustrato de arroz y sólo son separadas al momento de la aplicación, podrían estar en contacto con solutos compatibles resultantes de los procesos metabólicos del hongo durante su crecimiento sobre el arroz, los cuales son adsorbidos por la pared celular de la espóra, confiriendo grados de protección y resistencia al deterioro durante el almacenamiento previo a la

aplicación, mientras que en los preformulados las esporas pudieron haber perdido esta característica por acción de un tiempo más prolongado de secado durante la elaboración de la formulación, que el sugerido en la metodología, lo cual puede generar movilidad de solutos compatibles dentro del granulado húmedo haciendo que queden retenidos en los coadyuvantes y no en la espora donde fueron adsorbidos en la fase final de la fermentación en el cultivo sobre el sustrato de arroz. Se puede pensar que agregando solutos compatibles se mejora esta característica (Beltrán, Velásquez y Torrenegra, 1998).

Por otra parte, para esta evaluación se utilizó un lote diferente de coadyuvantes; de un lote a otro de coadyuvantes se modifican las propiedades de retención de agua durante el proceso de obtención del mismo, esto hace que la capacidad de absorción de agua aumente o disminuya, lo cual se refleja en la etapa de granulación húmeda del proceso de formulación, cuando hay cambio de materia prima es necesario hacer una evaluación previa de las características que pueden alterar el ingrediente activo en el proceso de formulación.

Lo anterior nos indica que el aumento en la humedad final de la granulación húmeda de los preformulados, y consecuentemente el aumento en el tiempo de secado, provocó un comportamiento diferente al encontrado en otros procesos de elaboración con los mismos ingredientes para las mismas combinaciones de las formulaciones<sup>2</sup>. Este aspecto de calidad y comportamiento de los coadyuvantes como materia prima no se consideró de importancia en el momento de la elaboración, pero pudo contribuir en la marcada reducción en la expresión de mortalidad del hongo en el campo (25,25 y 32,32%) si se compara con los resultados en el laboratorio (97 y 98%).

Estos resultados hacen necesario considerar como requisito indispensable evaluar el comportamiento de los coadyuvantes entre lotes diferentes de fabricación de materias primas, para evitar modificaciones en el

comportamiento de las formulaciones, que pueden ser ocasionadas durante la granulación en el proceso de elaboración, debido a los requerimientos de humedad de los coadyuvantes.

## CONCLUSIONES

- En la etapa de laboratorio todos los preformulados presentaron mejores características fisicoquímicas y microbiológicas que las esporas puras, indicando que los coadyuvantes utilizados son adecuados para la formulación de hongos entomopatógenos.
- La mortalidad de la broca, por efecto de los preformulados, en condiciones de laboratorio ocurre entre el día cuarto y séptimo después de la inoculación de los insectos.
- La combinación de los coadyuvantes Tween 80, Glicerina, Carboximetilcelulosa y Alginato (preformulado 4), potencializan la actividad biocontroladora de *B. bassiana* en campo, causando mortalidad de 32,32%, estadísticamente superior al 15,09% de las esporas puras.
- El testigo comercial causó una mortalidad del 62,19% en condiciones de campo, valor importante para *B. bassiana* como biocontrolador, indicando que la eficiencia del hongo pudo ser mejorada, debido a que durante el tiempo de almacenamiento, las esporas no se separaron del sustrato de arroz, el cual con sus subproductos adsorbidos ayudó a preservar la acción del hongo lo cual se vio reflejado en campo.
- En condiciones de campo se obtuvo un 4,01 y 4,25% de mortalidad en las parcelas testigo, corroborando la presencia natural de *B. bassiana* bajo las condiciones del ambiente cafetero.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Disciplina de Entomología de Cenicafé, especialmente de la planta piloto de control biológico.

<sup>2</sup> Datos sin publicar: Dr. Elena Velásquez. Investigador Científico II, Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

## LITERATURA CITADA

- Alves, S.B.; Pereira, R.M.; Stimac, J.L.; Vicira, S.A. (1996). "Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures". *Biocontrol Science and Technology* 6(4): 575-581.
- Arrubla M., P.F.; Cárdenas M., R.; Posada F., F.J. (2000). *Adherencia sobre la broca del café de las esporas de Beauveria bassiana formulados en polvo y líquido*. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 27. Medellín, Julio 26-28, 2000. Resúmenes. Medellín: SOCOLEN. p. 9.
- Beltrán G., L.A.; Velásquez S., E.T.; Torrenegra, R.D. (1998). *Determinación de carbohidratos en esporas de B. bassiana (Balsamo) Vuillemin*. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 25. Cali, Julio 16-18, 1998. Resúmenes. Cali: SOCOLEN. p. 92.
- Bustillo P., A.E.; Cárdenas M., R.; Villalba G., D.A.; Benavides M., P.; Orozco H., J.; Posada F., F.J. (1998). *Desarrollo de un programa de manejo integrado de la broca del café, Hypothenemus hampei (Ferrari) en Colombia*. Chinchiná, Cenicafe. pp. 1-93.
- Bustillo P., A.E. (2002). "El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia". *Boletín Técnico Cenicafe* 24: 1-40.
- Consolo, V.F.; Salerno, G.L.; Bero n, C.M. (2003). "Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*". *Biocontrol* 48: 705-712.
- Decazy, B. (1987). *Descripción, biología, ecología y control de las principales plagas del cafeto*. In: CURSO Regional sobre Manejo Integrado de Plagas del Cafeto con énfasis en Broca del Fruto *Hypothenemus hampei* (Ferrari), 2. San Pedro Sula, Julio 21-26, 1987. Guatemala: IICA. p. 211-218.
- Edgington, S.; Segura, H.; De la Rosa, W.; Williams, T. (2000). "Photoprotection of *Beauveria bassiana*: testing simple formulations for control of the coffee berry borer". *International Journal of Pest Management* 46(3): 169-176.
- Fajardo L., M.; Rodríguez del C., J.J. (1995). *Efecto de la humedad y la temperatura sobre el comportamiento fisiológico de las esporas de Beauveria bassiana*. Tesis: Biología . Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 165 p.
- Hernández, V.M. (2003). *Efecto del contenido de humedad de conidios formulados de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) sorokin sobre la viabilidad y producción de exudados en almacenamiento y virulencia sobre Schistocerca gregaria (Orthoptera: Acrididae)*. Tesis : Doctorado. Área de biotecnología, Universidad de Colima, México. 130 p.
- Hedgecock, S.; Moore, D.; Higgins, P.M.; Prior, C. (1995). "Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in an oil formulation". *Biocontrol Science and Technology* 5: 371-377.
- Hong, D.; Gunn, J.; Ellis, H.R.; Jenkins, E.N.; Moore, D. (2001). "The effect of storage environmental of the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*". *Mycological Research* 105(5): 597-602.
- Marín, P.; Bustillo P., A.E. (2002). "Pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos". In: *Curso Internacional Teórico-Práctico sobre Entomopatógenos y Parasitoides que Atacan la Broca del Café*. Chinchiná, Cenicafe. p. 72-116.
- Marques, E.J.; Alves, S.B.; Marques, I.M.R. (1999). "Effects of the temperature and storage on formulation whit mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42(2): 133-160.
- Olarte O., E.D. (1993). *Optimización de un medio de cultivo para la producción masiva en superficie del hongo Beauveria bassiana*. Tesis para optar al título de Tecnóloga Química. Facultad de Química Industrial, Corporación Tecnológica de Bogotá, Santafé de Bogotá. 133 p.
- Posada F., F.J. (1998). *Production, formulation and application of Beauveria bassiana for control of Hypothenemus hampei in Colombia*. Tesis: Philosophy Doctor. Ascot, University of London. 227 p.

Velásquez S., E.T. (2002). "Diseño de formulaciones de esporas aéreas de *B. bassiana*". In: *Curso Internacional Teórico-Práctico sobre Entomopatógenos y Parasitoides que Atacan la Broca del Café*. Chinchiná, Cenicafé. p. 165-175.

Vélez A., P.E.; Posada F., F.J.; Marín, P.; González G., M.T.; Osorio V., E.; Bustillo P., A.E. (1997). "Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos". *Boletín Técnico Cenicafé* 17: 1-37.

Villalba G., D.A.; Bustillo P., A.E.; Chaves C., B. (1995). "Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia". *Cenicafé* 46(3): 152-163.